

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Off nlegungsschrift  
⑩ DE 198 12 332 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 12 P 19/04  
C 12 P 19/18

②1 Aktenzeichen: 198 12 332.9  
②2 Anmeldetag: 20. 3. 98  
④3 Offenlegungstag: 23. 9. 99

⑦1 Anmelder:

Horlacher, Reinhold, 78465 Konstanz, DE; Boos,  
Winfried, 78464 Konstanz, DE; Peist, Ralf, 78464  
Konstanz, DE; Böck, August, 82269 Geltendorf, DE;  
Pajatsch, Markus, 80797 München, DE

⑦2 Erfinder:

gleich Anmelder

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤4 Verfahren zur Synthese von <sup>13</sup>C- oder <sup>14</sup>C-markierten linearen Maltodextrinen sowie zyklischen Maltodextrinen mittels einfacher Reaktionen durch mikrobielle Enzyme sowie diese Mikroorganismen selbst

⑤7 Verfahren zur Synthese von <sup>13</sup>C- oder <sup>14</sup>C-markierten linearen Maltodextrinen sowie zyklischen Maltodextrinen mittels einfacher Reaktionen durch mikrobielle Enzyme sowie diese Mikroorganismen selbst.

Die Synthese von markierten, linearen oder zyklischen Maltodextrinen erfolgt bislang hauptsächlich über Begasung von z. B. Algen oder Tabakblättern mit markiertem CO<sub>2</sub> und anschließender Extraktion der gewünschten Produkte. Bedingt durch diese Methode ist die Ausbeute sehr klein und die spezifische Aktivität der Produkte sehr gering. Durch das neue Verfahren der Synthese mittels einfacher enzymatischer Reaktionen erreicht man wesentlich höhere Ausbeuten bei zugleich hoher spezifischer Aktivität der Produkte.

Durch Inkubation gereinigter Enzyme oder Zellextrakte, die die benötigten Enzyme enthalten, und markierter Maltose, entstehen durch enzymatische Reaktionen Maltodextrine unterschiedlicher Kettenlänge. Bei Anwesenheit einer weiteren enzymatischen Aktivität (Cyclodextrin Glucanotransferase) können genügend lange Maltodextrine zyklisiert werden. Die Reaktionsprodukte können mittels einfacher Methoden gereinigt werden. Die Ausbeuten und die spezifische Aktivität der Produkte liegt weit über der der bekannten Verfahren.

Synthese von markierten linearen und zyklischen Maltodextrinen aus Maltose durch enzymatische Reaktionen.

DE 198 12 332 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Synthese von  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten linearen Maltodextrinen sowie zyklischen Maltodextrinen aus  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierter Maltose mittels enzymatischer Reaktionen. Die eingesetzte Maltose wird dabei mit hoher Ausbeute in die Reaktionsprodukte umgesetzt. Die spezifische Aktivität dieser Produkte beträgt dabei mindestens die der eingesetzten Maltose, in der Regel jedoch ein Vielfaches davon. Die Reaktionsprodukte können durch einfache Methoden getrennt und aufgereinigt werden.

Maltodextrine sind Saccharide, welche durch Polymerisation von Glukose entstehen. Man unterscheidet sie je nach Kettenlänge als Maltose ( $n = 2$ ), Maltotriose ( $n = 3$ ) etc. Maltodextrine sind sehr weit verbreitet. Viele Organismen können Maltodextrine als Kohlenstoffquelle nutzen. Zyklische Maltodextrine (Zyklodextrine) entstehen durch Zyklisierung von linearen Maltodextrinen. Auch sie werden anhand ihrer Kettenlänge unterschieden, wobei alpha-Zyklodextrin aus 6 Glukoseeinheiten, beta-Zyklodextrin aus 7 und gamma-Zyklodextrin aus 8 Glukoseeinheiten besteht. Zyklodextrine sind relativ weit verbreitet und werden von zahlreichen Organismen als Kohlenstoffquelle genutzt. Dabei werden die im ringinneren hydrophoben Zyklodextrine durch die Organismen spezifisch aufgenommen. Das hydrophobe Ringinnere der Zyklodextrine kann dabei zum Transport von anderen, kleinen Molekülen in das Zellinnere genutzt werden. Hierzu wird die zu transportierende Substanz im Inneren des Zyklodextrinmoleküls eingeschlossen und gelangt mittels diesem "Carrier" in die Zelle.

Um den Stoffwechsel von Dextrinen in Organismen untersuchen zu können, benötigt man  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierte Ausgangsprodukte. Auch bei der Untersuchung des Verhaltens der Zyklodextrine als "Carrier" z. B. für das Einschleusen von Wirkstoffen benötigt man markierte Substanzen.

Zur Zeit sind im Handel keine  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten linearen oder zyklischen Maltodextrine erhältlich.

Für die Synthese von  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten Dextrinen und Zyklodextrinen sind so gut wie keine Verfahren bekannt. Bisher existieren nur einige Verfahren zur Synthese von nicht markierten zyklischen Dextrinen aus linearen Dextrinen. Hier wäre z. B. Vetter, D et al., Carbohydr. Res. 1992 223: 61-69 und Morita, T. et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 1996 56: 311-324 zu nennen. Die Synthese von linearen, markierten Kohlenstoffverbindungen wie Glukose und andere Saccharide erfolgt durch Begasung von z. B. Algen oder Tabakblättern mit markiertem  $\text{CO}_2$  und anschließender Extraktion der gewünschten Produkte (Kollman, V.H. et al. Biochem. Biophys. Res. Com. 1973 50: 826-831 und Kollman, V.H. et al. Carbohydr. Res. 1979 73: 193-202).

Diese genannten Verfahren beinhalten gravierende Nachteile. So sind z. B. bei der Synthese mittels Organismen die Ausbeuten trotz hohem Aufwand sehr gering, zahlreiche unerwünschte Nebenprodukte treten auf. Als größtes Manko muß zudem die geringe spezifische Aktivität der isolierten Produkte angesehen werden.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein einfaches, kostengünstiges Verfahren zur Synthese von  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten linearen und zyklischen Maltodextrinen bereitzustellen, das die Nachteile der bekannten Verfahren, insbesondere die geringen Ausbeuten und die geringe spezifische Aktivität vermeidet.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Gewinnung von  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten linearen und zyklischen Maltodextrinen aus  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierter Maltose, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Produkte enzymatisch synthetisiert werden. Dies kann durch gereinigte En-

zyme oder Zellextrakte, welche die Enzymaktivität beinhalten, geschehen. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Mikroorganismen, die diese Enzyme synthetisieren und gleichzeitig bestimmte Abbauende oder modifizierende Enzyme nicht mehr synthetisieren.

Kern der Erfindung ist eine leicht zu kontrollierende enzymatische Reaktion, die in-vitro zur Synthese von linearen und zyklischen Dextrinen heran gezogen werden kann. Dabei haben die Reaktionsprodukte mindesten die spezifische Aktivität der eingesetzten Maltose, in der Regel aber ein Vielfaches davon.

Der Mikroorganismus, dessen Extrakt oder dessen gereinigte Enzyme zur effektiven Synthese von  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten linearen oder zyklischen Maltodextrinen herangezogen werden kann, umfaßt in seiner bevorzugten Ausführungsform folgende 6 Hauptmerkmale:

- Alle Gene, die direkt zur Synthese von linearen Maltodextrinen benötigt werden, liegen als kontrolliert exprimierbare Allele vor.
- Die Polymerisierungsreaktion kann wahlweise mit Zellextrakten oder gereinigten Komponenten des Mikroorganismus durchgeführt werden.
- Die zyklisierende Enzymaktivität kann wahlweise in diesem Mikroorganismus kontrolliert expremiert oder in Form eines gereinigten Enzyms eingesetzt werden.
- Unerwünschte enzymatische Nebenreaktionen werden durch Mutationen der entsprechenden kodierenden Gene verhindert.
- Die entstehende markierte Glukose kann durch Glukokinase oder Hexokinase in markierte Glukose-6-Phosphat überführt werden.
- Die Reaktionsprodukte können leicht und spezifisch gereinigt werden.

Ein Ausführungsbeispiel zur Realisierung der Erfindung wird anhand der Synthese von  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten linearen oder zyklischen Maltodextrinen aus  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierter Maltose mittels Extrakten aus *Escherichia coli* und einer Enzymaktivität aus *Klebsiella oxytoca* bzw. *Thermococcus litoralis* erläutert:

- 1) Der *Escherichia coli* Bakterienstamm trägt das zur Synthese von linearen Maltodextrinen nötigen Gen *malQ* unter seinem Wildtyp-Promotor oder einem anderen regulierbaren Promotor auf dem Chromosom oder einem Plasmid. Als Promotor zur gezielten Expression dient der *tac*-Promotor oder ein anderer regulierbarer Promotor. An Stelle der Enzymaktivität von *Escherichia coli* kann auch eine vergleichbare Enzymaktivität eines anderen Organismus herangezogen werden.
- 2) Durch Mutationen in Genen, welche für die Verwertung Maltodextrinen essentiell sind, wird der Abbau der synthetisierten Maltodextrine verhindert. Dies wird durch eine Mutation in *malP*, *malS*, *malZ* und/oder anderen Genen erreicht. Diese Mutation kann eine Deletion und/oder eine Insertion eines Transposons oder einer Resistenzkassette sein.
- 3) Das Gen für die zyklisierende Enzymaktivität (Cyclodextrin Glucanotransferase) kann in *Escherichia coli* gezielt (induzierbar) expremiert werden oder aus dem jeweiligen Organismus gereinigt werden. Diese Enzymaktivität kann aus *Klebsiella oxytoca*, *Thermococcus litoralis* oder einem anderen Organismus sein.
- 4) Die Synthese aller Produkte erfolgt in-vitro mit Zellextrakt der die jeweiligen Enzyme enthält oder mit den jeweiligen gereinigten, homolog oder heterolog expre-

mierten Enzymen.

5) Die bei der Synthesereaktion frei werdende Glukose kann durch gleichzeitige Inkubation mit Glukokinase oder Hexokinase und ATP in Glukose-6-Phosphat überführt werden. Die entsprechenden Enzyme können entweder gereinigt der Reaktion zugegeben oder in dem Escherichia coli Stamm, welcher zur Herstellung der Extrakte dient, reguliert koexpressiert werden.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Synthese von  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierten linearen Maltodextrinen und Zyklodextrinen aus  $^{13}\text{C}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -markierter Maltose, **dadurch gekennzeichnet**, daß die eingesetzte Maltose durch enzymatische Reaktionen mit hoher spezifischer Ausbeute zu linearen und zyklischen Dextrinen umgesetzt wird. 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß keine unerwünschten enzymatischen Nebenreaktionen die Reaktionsedukte und Reaktionsprodukte verändern. 20
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische Aktivität der Produkte mindestens die der eingesetzten Maltose entspricht, in der Regel aber ein Vielfaches davon beträgt. 25
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einfache enzymatische Reaktionen handelt, die sowohl mit Zellextrakten als auch mit gereinigten Enzymen ausgeführt werden können. 30
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es bei den enzymatischen Aktivitäten um eine Amylomaltase (4-alpha-Glucanotransferase) und Cyclodextrin-Glucanotransferase handelt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Disproportionierungsreaktion handelt. 35
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch gleichzeitige Inkubation mit Glukokinase oder Hexokinase und ATP zusätzlich markierte Glukose-6-Phosphat entsteht. 40
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß alle Reaktionsprodukte mit einfachen Mitteln aus dem Reaktionsansatz extrahiert werden können.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Enzymen um Proteine aus den Mikroorganismen Escherichia coli, Klebsiella oxytoca oder Thermococcus lithoralis handelt. 45
10. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß dies durch Mutation in den Genen für die Maltodextrin-Phosphorylase und Amylasen (bei Escherichia coli malP, malS und malZ) erzielt wird. 50
11. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerisierungsreaktion und Zyklisierungsreaktion sowohl zeitlich als auch räumlich getrennt ablaufen können. 55
12. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Enzymaktivitäten getrennt in zwei Proteinen als auch vereint in einem Protein vorliegen können. 60
13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um genetisch stabilen Mutationen handelt.

- Leerseite -

19 FEDERAL REPUBLIC

GERMANY



GERMAN PATENT  
OFFICE

# 12 Disclosure Document

10 DE 198 12 332 A 1

51 Int. Cl.<sup>5</sup>

C 12 P 19/04

21 File Reference: 198 12 332.9  
22 Application date: March 20, 1998  
43 Disclosure Date: September 23, 1998

C 12 P 19/18

## 71 Applicant:

Horlacher, Reinhold, 78465 Konstanz, DE; Boos,  
Winfried, 78484 Konstanz, DE; Peist, Ralf, 78484  
Konstanz, DE; Böck, August, 82269 Geltendorf, DE;  
Pejatsch, Markus, 80797 Munich, DE

## 72 Inventor:

Same as Applicant

D  
E  
1  
9  
8  
1  
2  
3  
3  
2  
A  
1

The following information is taken from the documentation submitted by the Applicant

**54 Procedure for the synthesis of <sup>13</sup>C or <sup>14</sup>C labelled linear maltodextrins, as well as cyclical maltodextrins by means of simple reactions by microbial enzymes as well as these micro-organisms themselves.**

**51 Procedure for the synthesis of <sup>13</sup>C or <sup>14</sup>C labelled linear maltodextrins, as well as cyclical maltodextrins by means of simple reactions by microbial enzymes as well as these micro-organisms themselves.**

The synthesis of labelled, linear or cyclical maltodextrins has up to now been achieved mostly by means of gasing of, for example, algae or tobacco leaves with labelled CO<sub>2</sub> and the subsequent extraction of the desired products. Limited by this method, the yield is very small and the specific activity of the products

D  
E  
1  
9  
8  
1  
2  
3  
3  
2  
A  
1

very slight. By the new process of synthesis using simple enzymatic reactions we can reach significantly higher yields with a high concurrent specific activity of the products.

By the incubation of purified enzymes or cell extracts that contain the needed enzymes and of labelled maltose, maltodextrins of various chain lengths are created by means of enzymatic reactions. In the presence of a further enzymatic activity (cyclodextrin glucanotransferase) sufficiently long maltodextrins can be "cycliated" [Translator's note: unknown verb]. The products of the reaction can be purified by a simple method. The yield and specific activity of the products is far above that of the well-known method.

The synthesis of labelled linear and cyclical maltodextrins from maltose by enzymatic reactions, [Translator's note: this sentence is cut off at the end of the page].

1

#### Description

The invention concerns a process for the synthesis of  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled linear  
5 maltodextrins as well as cyclical maltodextrins from  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled maltose by means of enzymatic reactions. A high yield of the input maltose is thereby transformed into the end products. Also, the specific activity of these products is

at least equivalent to that of the maltose used, but as a rule, a multiple thereof.

The reaction products can be separated and purified by simple means.

10

Maltodextrins are saccharides that arise through the polymerization of glucose.

They are differentiated according to their chain length into maltose ( $n = 2$ ),

maltotriose ( $n + 3$ ), etc. Maltodextrins are very widespread. Many organisms can use maltodextrins as a source of carbon. Cyclical maltodextrins (cyclodextrins)

15 are created by the cyclization of linear maltodextrins. These also are

differentiated by the lengths of their chains, whereby alpha-cyclodextrin consists of 6 glucose units, beta-cyclodextrin consists of 7 and gamma-cyclodextrin of 8 glucose units. Cyclodextrins are relatively widespread, and are used by

numerous organisms as a source of carbon. Thereby, the organism specifically  
20 assimilate the small-ring [Translator's note: literally: "ring-interior"] hydrophobic cyclodextrins.

The hydrophobic ring interior of cyclodextrins can also be used for the transport of other small molecules into the cell interior. For this purpose, the substance to be transported is enclosed in the interior of the cyclodextrin molecules and

25 arrives in the cell by means of this carrier.

In order to study the metabolism of dextrans within organisms, we need to start with products that are  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled. Similarly, for the study of the behaviour of cyclodextrins as carriers, for example, for the infiltration of active agents, we  
30 need labelled substances.



At this time, no  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled linear or cyclical maltodextrins are available on the market.

- 35 For the synthesis of  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled dextrans and cyclodextrins, there are practically no known procedures. Up to now, there have only existed a few processes for the synthesis of unlabelled cyclical dextrans from linear dextrans. In this context we could, for example, name Vetter, D. et al., *Carbohydr. Res.* 1992 223: 61-69 and Morita, T. et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1996 56: 311-324.
- 40 The synthesis of linear labelled carbon compounds, such as "glikose" [the word "glucose" is only found in non-English and non-German publications; maybe "glucose" is meant] and other saccharides is carried out by gasing of, for example, algae or tobacco leaves with labelled  $\text{CO}_2$  and subsequent extraction of the desired products (Kollman, V.H. et al., *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1973
- 45 50: 826-831 and Kollman, V.H. et al., *Carbohydr. Res.* 1979 73: 193-202).

The procedures cited entail serious disadvantages. Thus, in the synthesis by means of organisms, despite high costs, the yield is very low. Numerous undesirable by-products appear. Without a doubt, the greatest drawback is the

50 low specific activity of the isolated products.

The task of the present invention, therefore, is to offer a simple, reasonably priced process for the synthesis of  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled linear and cyclical

55 maltodextrins, which avoids the disadvantages of the current methods, in particular, the low yield and the slight specific activity.

This task is fulfilled by a process of synthesising  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled linear and cyclical maltodextrins from  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled maltose whereby the products are synthesized enzymatically. This can be done with purified enzymes  
60

## 2

or cell extracts that contain the enzymes. A further subject of the invention are micro-organisms, which synthesize these enzymes and – at the same time –  
5 stop synthesizing certain degrading and modifying enzymes.

The core of the invention is an easily controlled enzymatic reaction, which can be used *in vitro* for the synthesis of linear and cyclical dextrans. Thereby the specific activity of these products is at least equivalent to that of the input maltose, but, as  
10 a rule, a multiple thereof.

The micro-organism of which the extract or purified enzymes can be used for the effective synthesis of  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled linear and cyclical maltodextrins incorporates, in its preferred form, the following 6 major characteristics:

- 15 • All the genes that are directly necessary for the synthesis of linear maltodextrins are present as controlled expression alleles.

- The polymerizing reaction can optionally be carried out either with cell extracts or purified components of the micro-organisms.
- The enzyme activity that causes the cyclization can optionally be used either  
20 in this micro-organism, controlled and expressed, or in the form of a purified enzyme.
- The unwanted enzymatic side-reactions are prevented by mutations of the corresponding coding genes.
- The resulting labelled glucose can be transformed into labelled glucose-6-  
25 phosphate by glucokinase or hexokinase.
- The reaction products can be easily and specifically purified.

The implementation example for the invention is explained by means of the synthesis of  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled linear or cyclical maltodextrins from  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$   
30 labelled maltose, using extracts of *Escherichia coli* and enzyme activity from *Klebsiella oxytoca* or *Thermococcus litoralis*:

1. The *Escherichia coli* bacterium strain carries the gene which is necessary for the synthesis of linear maltodextrins, i.e., malQ, under its wild-type promotor or another regulating promotor on the chromosome or a plasmid.  
35 As the promotor to the intended expression the tac-promotor can be used or any other promotor that can be regulated. Instead of the enzyme activity of *Escherichia coli*, a comparable enzyme activity from some other organism can be employed.

2. Through the mutation of genes that are essential for the utilization of maltodextrins, the decomposition of the synthesized maltodextrins is prevented. This is achieved through a mutation in malP, malS, malZ and/or other genes. This mutation can be a deletion and/or an insertion of a transposon or a resistance cassette.
3. The gene for the cyclization enzyme activity (cyclodextrin glucanotransferase) can be expressed selectively in *Escherichia coli* (induceable) or purified out of the particular organism. This enzyme activity can come from *Klebsiella oxytoca* or *Thermococcus litoralis* or from some other organism.
4. The synthesis of all products happens *in vitro*, with cell extract, which contains the appropriate enzymes or with the corresponding purified, homologous or heterologous expression enzymes.

### 3

5. The glucose [Glikose] that is freed by the synthesis reaction can be transformed into glucose-6-phosphate by a concurrent incubation with glucokinase or hexokinase and ATP. The corresponding enzymes can either be added to the reaction in purified form or they can be regulated and co-expressed in the *Escherichia coli* strain that serves for the production of the extracts.

1. Process for the synthesis of  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled linear maltodextrins as well as cyclodextrins from  $^{13}\text{C}$  or  $^{14}\text{C}$  labelled maltose whereby the maltose used is transformed, with high specific yield, into linear and cyclical dextrins by means of enzymatic reactions.
- 15 2. Process according to Claim 1 whereby no unwanted enzymatic side-reactions alter the reaction educts and reaction products.
3. Process according to Claim 1 whereby the specific activity of the products is at least equivalent to that of the maltose used, but as a rule, is a multiple of it.
4. Process according to Claim 1 whereby simply the enzymatic reactions  
20 involved can be carried out either with cell extracts or equally well with purified enzymes.
5. Process according to Claim 1 whereby the enzymatic activities involved are amylomaltase (4-alpha-glucanotransferase) and cyclodextrin glucanotransferase.
- 25 6. Process according to Claim 1 whereby a disproportionation reaction is involved.
7. Process according to Claim 1 whereby the concurrent incubation with glucokinase or hexokinase and ATP (illegible) [produces?] additional labelled glucose-6-phosphate.
- 30 8. Process according to Claim 1 whereby all reaction products can be extracted from the reaction input by simple means.

9. Process according to Claim 1 whereby the enzymes used are proteins from the micro-organisms *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* or *Thermococcus litoralis*.
- 35 10. Process according to Claim 2 whereby this is achieved by mutation in the genes for maltodextrin phosphorylase and amylases (with *Escherichia coli*, malP, malS, and malZ).
11. Process according to Claim 4 whereby the polymerization reaction and cyclization reaction can be run separately, both in time and space.
- 40 12. Process according to Claim 5 whereby the two enzyme activities can be present separately, in two proteins, and also united in a single protein.
13. Process according to Claim 9 whereby genetically stable mutations are involved.